



**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METFORMİNİN, SIÇANLARDAN ELDE EDİLMİŞ VE**  
**LİPOLİSAKKARİD İLE İNDÜKLENMİŞ MONOSİTLERDE**  
**TNF- $\alpha$  SALINIMINA ETKİLERİ**

**EMRE GEDİKLİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİVAS - 2012**

METFORMİNİN, SIÇANLARDAN ELDE EDİLMİŞ VE  
LİPOLİSAKKARİD İLE İNDÜKLENMİŞ MONOSİTLERDE  
TNF- $\alpha$  SALINIMINA ETKİLERİ

EMRE GEDİKLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI  
2012



**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METFORMİNİN, SIÇANLARDAN ELDE EDİLMİŞ VE  
LİPOLİSAKKARİD İLE İNDÜKLENMİŞ MONOSİTLERDE  
TNF- $\alpha$  SALINIMINA ETKİLERİ**

**EMRE GEDİKLİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. A. SERDAR SOYDAN**

**SİVAS - 2012**

Bu alışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

\_\_\_\_\_

Üye

\_\_\_\_\_

Üye

\_\_\_\_\_

Üye

\_\_\_\_\_

Üye (Danışman)

\_\_\_\_\_

### ONAY

Bu tez çalışması . . / . . / . . tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ali Altuğ BIÇAKÇI

SAğLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

## ÖZET

### METFORMİNİN, SIÇANLARDAN ELDE EDİLMİŞ VE LİPOLİSAKKARİD İLE İNDÜKLENEN MONOSİTLERDE TNF- $\alpha$ SALINIMINA ETKİLERİ

EMRE GEDİKLİ

Yüksek Lisans Tezi, Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. SERDAR SOYDAN

2012, 40 sayfa

İmmün sistem yanıtının bir sonucu olan inflamasyon, pek çok hastalıkta ortaya çıkan bir tablodur (ateroskleroz, hipertansiyon, diyabet, kanser, romatoid artrit gibi). Diyabet tedavisinde kullanılan metforminin, kan şekerini düzenleyici etkisinden bağımsız olarak, antiinflamatuvar etkisinde olduğu bulunmuştur. Ancak etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada, metforminin, lipopolisakkarid (LPS) ile inkübe edilmiş sıçan monositlerinden proinflamatuvar sitokinler olan TNF- $\alpha$  ve IL-6 sentez ve salınımı üzerindeki etkisi araştırıldı.

Erkek 8-12 haftalık sağlıklı sıçanlardan (n=5, 200-250 g), genel anestezi (Xylazin 3 mg/kg + Ketamin 90 mg/kg) altında kardiyak puncture yöntemiyle 5 ml kan alındı ve steril EDTA'lı tüplere konuldu. Santrifuj (ficoll 3ml, 400xg, 30dk) yardımıyla mononükleer hücreler ayrıştırıldı. Hücreler RPMI 1640 media ile sulandırıldı ( $3.3 \pm 0.2 \times 10^5$ /ml). Hücreler önce metformin (2.5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 250  $\mu$ M) ile 2,5 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda LPS (100 ng/ml, 1 $\mu$ g/ml) eklenerek 5 saat daha inkübe edildi. Daha sonra santrifuj (400xg, 20dk.) yapıldı, süpernatantlar -80°C'de, ELISA yöntemi ile TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeyleri ölçülene kadar saklandı.

Hücrelerin deneyler sonunda canlılık oranları %98'in üzerindeydi. TNF- $\alpha$  miktarları arasındaki fark, LPS 100 ng/ml ile, LPS + metformin (2.5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 250 $\mu$ M) grupları karşılaştırıldığında (2179 $\pm$ 359 ve 1613 $\pm$ 437, 2915 $\pm$ 572, 6059 $\pm$ 948 pg/ml), istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05). LPS 1 $\mu$ g/ml ile, LPS+metformin (2,5 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 250 $\mu$ M) grupları karşılaştırıldığında (1752 $\pm$ 553 ve 3023 $\pm$ 745, 2344 $\pm$ 598, 6238 $\pm$ 841 pg/ml), 2.5 $\mu$ M (p<0,05) ve 250 $\mu$ M (p<0.05) metformin TNF- $\alpha$  değerlerini anlamlı şekilde artırırken, 25 $\mu$ M metformin anlamlı bir fark oluşturmadı (p>0.05). IL-6 miktarları ELİSA yöntemi ile ölçülecek miktarda bulunmadı.

Bu konuda yapılan diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, metforminin proinflatuvar sitokinlerin sentezini inhibe ettiği bulunmuştur. Bu çalışmada, metformin, LPS ile indüklenen sıçan mononükleer hücrelerinden, TNF- $\alpha$  sentez ve salınımını, azaltmaktan ziyade artırmaya yönelik bir etki gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Metformin, sitokin, Lipopolisakkarid, inflamasyon, mononükleer sıçan hücresi

## ABSTRACT

### THE EFFECTS OF METFORMIN RELEASE OF TNF- $\alpha$ FROM LIPOPOLYSACCHARIDE INDUCED RAT MONOCYTE CELLS

Emre GEDIKLI

Master of Science Thesis, Department of Pharmacology

Supervisor: Prof. Dr. A. Serdar SOYDAN

2012, 40 pages

Inflammation which is a response of immune system is seen in many disorders such as atherosclerosis, hypertension, diabetes, cancer, rheumatoid arthritis. Metformin, an oral antidiabetic drug, has antiinflammatory effect apart from blood glucose regulatory effect. However, the mechanism of antiinflammatory effect is not clearly understood. In this study, the effect of metformin on the release of cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) from LPS stimulated rat mononuclear blood cells was investigated.

Blood samples (5ml) were taken from healthy, male, 8-12 weeks old rats (n=5, 200-250g) through cardiac puncture under general anesthesia (Xylazine 3 mg/kg + Ketamine 90 mg/kg) into sterile EDTA containing tubes. Mononuclear cells were separated by centrifugation (ficoll 3ml, 400xg, 30min.) and were resuspended in RPMI 1640 media ( $3.3\pm 0.2\times 10^5$ /ml). Cells were then incubated with metformin (2.5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 250  $\mu$ M) for 2,5 hours followed by addition of LPS (100 ng/ml, 1 $\mu$ g/ml) for further 5 hours. Following centrifugation (400xg, 20min.), supernatants were kept at -80°C until the measurement of TNF- $\alpha$  and IL-6 by ELISA.

Cells viability was over 98% at the end of experiments. In terms of the amount of TNF- $\alpha$ , the difference of between LPS (100ng/ml) alone and LPS+metformin (2.5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 250  $\mu$ M) groups was not statistically different (2179 $\pm$ 359 ve 1613 $\pm$ 437, 2915 $\pm$ 572, 6059 $\pm$ 948 pg/ml) respectively, p>0.05. When we compared the difference between LPS (1 $\mu$ g/ml) alone and LPS+metformin (2.5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 250  $\mu$ M) groups (1752 $\pm$ 553 ve 3023 $\pm$ 745, 2344 $\pm$ 598, 6238 $\pm$ 841 pg/ml) respectively, 2.5 $\mu$ M (p<0,05) ve 250 $\mu$ M (p<0.05) metformin increased the amount of TNF- $\alpha$  statistically whereas 25 $\mu$ M (p>0.05) metformin did not. The amount of IL-6 was not within measurable range in this study.



Metformin inhibited the synthesis of proinflammatory cytokines from monocytes isolated from mice and from human vascular smooth muscle cells, macrophages and endothelial cells induced with IL- 1 $\beta$ . In this study, metformin increased the amount of released TNF- $\alpha$  rather than decrease.

**Key words:** Metformin, cytokine, LPS, inflammation, mononuclear rat cells

## TEŞEKKÜR

Çalışma boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, emeğini esirgemeyen ve her an yanımda olduğunu hissettiren danıőmanım Sayın Prof. Dr. A. Serdar SOYDAN' a teşekkür ederim. Ayrıca Farmakoloji Anabilim Dalı Baőkanımız sayın Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ'e ve Farmakoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyeleri ve öğretim elemanlarına; sayın Prof. Dr. őahin YILDIRIM'a, sayın Prof. Dr. Kemal YILDIRIM'a, sayın Prof. Dr. İhsan BAĞCİVAN'a, sayın Yrd. Doç Dr. Bülent SARAÇ'a, sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALTUN'a, sayın Dr. Ezgi BALCI'ya öğrenimimde ve deneylerimde sağladıkları bilgi ve tecrübeleriyle yol gösterdikleri için teőekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda devamlı yanımda olan bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen arkadaşım Dr. Mesut PARLAK'a minnettarım.

Çalışmamın deney aşamasında kullandığım 'metformin'i isteğim üzerine bana gönderen ve çalışmama yardımcı olan "Bilim İlaç Firması" yetkililerine ve çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
<b>BÖLÜM I</b> .....	1
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
<b>BÖLÜM II</b> .....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İnflamasyon.....	3
2.1.1. İnflamasyonda Vasküler Olaylar.....	3
2.1.2. İnflamasyonda Hücreyel Olaylar.....	4
2.1.3. İnflamasyonun Kimyasal Mediatorleri.....	4
2.2. Sitokinler ve İnflamasyon.....	5
2.2.1. İnterlökin 6 ( IL-6 ).....	5
2.2.2. Tümör Nekrozis Faktör ( TNF- $\alpha$ ).....	6
2.3. Lipopolisakkarid(LPS).....	6
2.4. Metformin.....	7
2.5. Metformin ve İnflamasyon.....	7
<b>BÖLÜM III</b> .....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	9
3.2. Deneysel Hayvanlarının Seçimi.....	9
3.3. Deneysel Hayvanlarından Kan Örneklerinin Alınması.....	9
3.4. Mononükleer Hücrelerin Ayrıştırılması.....	10
3.5. Hücrelerin Sayılması ve Morfolojik Yapılarının İncelenmesi.....	10
3.6. Hücrelerin Canlılıklarının Kontrolü.....	11
3.7. Lipopolisakkarid ve Metforminin Hazırlanması.....	11
3.8. Hücrelerin LPS ve Metforminle İnkübasyonu.....	11
3.9. Sitokinlerin ( TNF $\alpha$ ve IL – 6 ) Ölçümü.....	12
3.9.1. TNF- $\alpha$ Ölçümü.....	12
3.9.2. IL-6 Ölçümü.....	13
3.10. İstatistik.....	14
<b>BÖLÜM IV</b> .....	15
4. BULGULAR.....	15
4.1. Pilot Çalışmalar.....	15
4.2. Hücrelerin Canlılıklarının Kontrolü.....	15
4.3. TNF- $\alpha$ Miktarları.....	15
4.4. TNF- $\alpha$ Değerlerinin LPS'nin Yüzdesi Olarak Değerlendirilmesi.....	17
4.5. IL-6 Ölçüm Değerleri.....	19

<b>BÖLÜM V</b> .....	20
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	20
<b>BÖLÜM VI</b> .....	24
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	24

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil.2.1.</b> İnflamasyon sürecindeki lökosit olayları.....	4
<b>Şekil.4.2.</b> LPS (100ng/ml) ile indüklenmiş mononükleer hücrelerden LPS ve LPS + Metformin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α miktarları .....	15
<b>Şekil.4.3.</b> LPS (1µg/ml) ile indüklenmiş mononükleer hücrelerden, LPS ve LPS + Metformin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α miktarları .....	17
<b>Şekil.4.4</b> Mononükleer hücrelerden LPS(100ng+V) ve LPS + Metformin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α miktarlarının, LPS 100ng/ml'nin yüzdesi olarak ifadesi .....	18
<b>Şekil.4.5.</b> LPS (1µg/ml) ile indüklenmiş mononükleer hücrelerden, LPS ve LPS+Metformin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α değerlerinin, LPS 1µg/ml'nin yüzdesi olarak ifadesi .....	20

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge.4.1.</b> Mononükleer hücrelerden LPS (100ng/ml) ve LPS + Metformin (2.5, 25, 250µM) etkisi ile salıverilen TNF-α (pg/ml) miktarları .....	15
<b>Çizelge.4.2.</b> Mononükleer hücrelerden LPS (1µg/ml) ve LPS + Metformin (2.5, 25, 250µM) etkisi ile salıverilen TNF-α (pg/ml) miktarları.....	16
<b>Çizelge.4.3</b> Mononükleer hücrelerden LPS(100ng/ml+V) ve LPS+Metformin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α miktarlarının, LPS 100ng/ml'nin yüzdesi olarak ifadesi .....	18
<b>Çizelge.4.4.</b> Mononükleer hücrelerden LPS(1µg/ml+V) ve LPS+Metformin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α miktarlarının, LPS 1µg/ml'nin yüzdesi olarak ifadesi .....	19

## KISALTMALAR DİZİNİ

TLR-4	Toll-Like reseptör 4
LPS	Lipopolisakkarit
LBP	Lipopolisakkarit bağlayıcı protein
T <sub>H</sub>	T Helper
IL	İnterlökin
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktör alfa
IL-6	İnterlökin 6
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
IFN	İnterferon
BOS	Beyin omurilik sıvısı
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü)
MHC-1	Major Histocompatibility kompleks
IFN- $\gamma$	İnterferon gama
VCAM	Vasküler hücre adhezyon molekülü
PGE	Prostaglandin
PAF	Trombosit aktive edici faktör
LDL	Low density lipoprotein
TF	Doku Faktörü
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz enzimi
COX-2	Siklooksijenaz 2 enzimi
PBS	Phosphate buffer saline
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzim Linked Immunosorbent Assay

## BÖLÜM I

### GİRİŞ ve AMAÇ

İmmün sistem hücrelerinin, sitokin sentezlemek suretiyle, endojen veya eksojen uyarılara karşı verdiği yanıtın bir sonucu olan inflamasyon, pek çok hastalıkta ortaya çıkan bir tablodur (ateroskleroz, hipertansiyon, diyabetes, kanser, romatoid artrit gibi). İnflamasyona aracılık eden pek çok endojen molekül vardır (sitokinler, histamin, siklooksijenaz ürünleri, NO, oksijen radikalleri gibi). Bunların arasında sitokinler, özellikle TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın rolü oldukça önemlidir. Toll-like reseptör 4 (TLR-4), insan monosit hücreleri yüzeyinde bulunan ve agonistleri aracılığı ile sitokin sentez ve saliverilmesine aracılık eden bir reseptördür (1). Aktivasyonu için endojen ve eksojen tanımlanmış agonistleri vardır. Önemli eksojen agonistlerden birisi, Gram (-) bakteri hücre duvarında bulunan lipopolisakkarid'dir (LPS) (2).

Metformin, diyabet tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Karaciğerde glukoz yapımını azaltır, glukozun barsaklardan emilimini azaltır ve insülin duyarlılığını artırır (periferik glukoz alımını ve kullanımını artırır). Metforminin, sıçanlarda cerrahi sonrası (kısmi hepatektomi) LPS ile oluşturulan sepsis modelinde, hem proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu hem de hemostatik değişiklikleri azalttığı gösterilmiştir (3). Metformin LPS ile indüklenmiş proinflamatuvar sitokinleri azaltırken, karaciğerde sentezlenen antiinflamatuvar sitokinlerin miktarını değiştirmemiştir (3). Metforminin, LPS veya oxLDL ile uyarılmış izole insan monositlerinde TNF- $\alpha$  yapımını ve doku faktörünün (TF) ekspresyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı bulunmuştur. İlave olarak hem TNF- $\alpha$  hem de TF mRNA düzeylerini azaltmıştır (4). Sıçanlarda, yağdan yüksek diyetle beslenme yoluyla oluşturulan alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması hastalığı modelinde, metformin, doku TNF- $\alpha$  miktarlarını düşürmüştür (5). Pioglitazon tedavisi altındaki diabet hastalarına, tedaviye metformin eklenmesi plazmadaki TNF- $\alpha$  miktarlarında anlamlı düşüşe neden olmuştur (6). Bu çalışmalar, metforminin kan şekerini düzenleyici etkisinden bağımsız olarak, antiinflamatuvar etkisi olduğu görüşünü desteklemektedir. Ancak etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır.

Bu çalışmada, metforminin antiinflamatuvar etkinliği olup olmadığını araştırmak amacı ile, sıçanlardan izole edilen ve LPS ile indüklenen periferik kan mononükleer



hücrelerinden salıverilen proinflamatuvar sitokinler olan TNF- $\alpha$  ve IL-6 miktarları üzerinde, metforminin etkisi araştırıldı.

## BÖLÜM II

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1. İnflamasyon

İnflamasyon fiziksel, kimyasal ve diğer etmenlerin (patojenler) neden olduğu bir doku hasarına karşı hücrel ve humoral düzeyde oluşan güçlü bir fizyolojik yanıttır. İnflamasyonda amaç hasarlayıcı etkeni ve ürünleri ortadan kaldırmak, zararlı olduğu yerde sınırlı tutmak, kontrol sağlandıktan sonra hasarlı dokuların tamirini ve yenilenmesini sağlamaktır (7,8,9).

İnflamasyon sırasında lokal olarak ısı artışı, ağrı, kızarıklık ve şişlik gibi belirtiler görülür. Sistemik olarak ise ateş, sedimantasyon, lökosit ve vasküler permeabilite artışı görülür. İnflamasyonun organizmada üç temel amacı vardır. Bunlar, hastalık etkenini yok etmek, yok edemiyorsa vücuttan ayrı tutmak ve hasarlı dokuları ortadan kaldırmaktır (8,9). Örneğin nekrotik dokularda, nekrozun yayılmasını ve bu ölü dokuların intoksik etkisini engellemek amacıyla nekrotik saha inflamatuvar etkiyle sınırlandırılmaya çalışılır. İnflamasyonun vasküler ve hücrel yanıtları, plazma hücrelerinden çıkan ve inflamatuvar bir uyararla meydana gelen kimyasal faktörlerle ortaya çıkmaktadır. Bu kimyasal mediyatörler bir arada veya sırayla etki ederek inflamatuvar yanıtın oluşmasını etkilerler. İnflamasyon patolojisi vasküler ve hücrel olaylar olmak üzere iki ana olayı içerir (10,11).

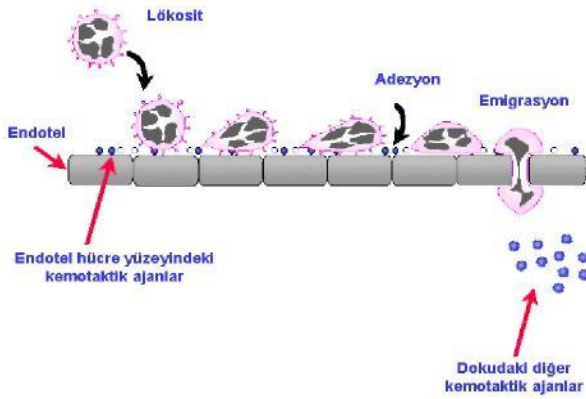
##### 2.1.1. İnflamasyonda Vasküler Olaylar

Vasküler akım ve permeabilite ile ilgili iki çarpıcı değişiklik söz konusudur. Arteriolde birkaç saniyelik kısa süreli vazodilatasyon oluşur ve erken dönemde ısı artışı ve kızarıklığa neden olur (12). Dolaşımdan ekstra vasküler sıvıya protein kaçıışı nedeniyle eritrosit stazı meydana gelir ve nötrofiller endotel boyunca marjine olurlar. Sonra interstisyel dokuya göç ederler. Vazodilatasyon ve artmış kan akımı intravasküler hidrostatik basıncı, bu da kapillerden sıvı filtrasyonunu artırır. Bu sıvı başlangıçta transuda niteliğinde olmakla birlikte, kısa sürede damar duvar geçirgenliğinin artması ile

değişir ve proteinden zengin sıvı yani eksudaya dönüşür. Sonuçta intravasküler ozmotik basınç azalır ve interstisyel ozmotik basınç artarak ödeme neden olur.

### 2.1.2. İnflamasyonda Hücresel Olaylar

Lökositlerin en çarpıcı fonksiyonu hasar yerine göçleridir. Lökositlerle ilgili olaylar sırasıyla: a) Marjinyasyon ve yuvarlanma, b) Adezyon, c) Emigrasyon, d) Fagositoz ve intravasküler yıkım, e) Lökosit ürünlerinin ekstrasellüler salınımıdır. İnflamasyon sürecindeki lökosit olayları Şekil 1’de gösterilmektedir(12).



Şekil 2.1. İnflamasyon sürecindeki lökosit olayları

### 2.1.3. İnflamasyonun Kimyasal Mediyatörleri

İnflamatuvar doku yanıtı oluşturulmasında aracılık eden kimyasal mediyatörlerden, ilk keşfedilen histamin olmakla birlikte, sayıları giderek artmaktadır. Mediyatörler, hasarlı dokudan, hücrelerden veya plazmadan köken alan çeşitli kimyasal maddelerdir. Histaminin yanında p maddesi, serotonin, nitrik oksit, sitokinler gibi kimyasal maddeler de inflamasyonda rol oynayan mediyatörlerdendir. Bazı ara ürünlerde inflamasyonda rol oynar (örn. siklooksijenaz ürünleri). Hasarlanmanın olduğu alandan bazı endojen kimyasal mediyatörler salınır. Sitokin adı verilen bu maddeler protein yapısında moleküllerdir(13-19).

## 2.2. Sitokinler ve İnflamasyon

CD4+ T lenfosit ve aktive makrofajlar gibi birçok hücre tipinden sentezlenen mediyatörlerdir. İmmatür CD4+ T hücreler ( $T_H0$ ) farklı sitokin sekrete edebilme yeteneğinde olan  $T_H1$  ve  $T_H2$  hücrelerine farklılaşma özelliğine sahiptirler (17). Sitokin sekresyonu, bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler, fiziksel incinmeler ve çeşitli inflamatuvar olaylarla uyarılabilirler. Sitokinler polipeptid yapıda olup inflamasyonda en önemlileri interlökinler (IL) ve tümör nekroz faktör-alfadır (TNF- $\alpha$ ). Özellikle IL-6 ve TNF- $\alpha$  birçok ortak biyolojik özellikleri paylaşır. Her ikisi de aktive makrofajlar, lenfosit ve diğer hücre tipleri tarafından sentezlenir ve proinflamatuvar sitokinler olarak adlandırılırlar (13-19).

### 2.2.1. İnterlökin 6

Multifonksiyonel bir sitokin olan IL-6'nın matür formunun moleküler ağırlığı 22000-30000kDa arasında değişir ve 184 aminoasitten oluşur (20,21). IL-6 geni 7. kromozom üzerindedir. Mononükleer fagositik hücreler IL-6'nın en önemli kaynağıdır. IL-6 aynı zamanda fibroblastlar, endotel hücreleri, B ve T lenfositler, hepatositler, keratinositler, glial hücreler ve kemik iliği stroma hücreleri tarafından da sentezlenir. (22).

IL-6, immün yanıtı, akut faz reaksiyonlarını ve hematopoezi regüle ederek konağın savunma mekanizmasında önemli bir rol oynar (20,23,24). TNF, IL-1, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), IFN-beta gibi sitokinler, antijenler, mitojenler ve bakteriyel endotoksinler (lipopolisakkarit) farklı hücre tiplerinde IL-6 oluşumunu uyarır. IL-6 inflamatuvar cevabın önemli bir mediyatörüdür. Enfeksiyon etkeni mikroorganizmalar ve onların ürünlerine karşı konak savunmasında yer alan hücrelerce ve hasar gören dokular tarafından salgılanır. Sepsis ve özellikle Gram(-) bakterilerin yaptığı septik şokta IL-6 ve TNF alfa seviyeleri yüksek bulunmuştur (25,26). Bakteriyel menenjitlerde, BOS'ta ve kanda IL-6 konsantrasyonu yükselmiştir (27,28). HIV enfeksiyonunda da monositlerden IL-6 salındığı gösterilmiştir. Enfeksiyon sırasında bazı sitokinler birbirini etkiler. IL-1 ve TNF direkt olarak IL-6 genine etki ederek IL-6 yapılmasını arttırır (29). IL-6'nın antiviral aktivitesi olmakla birlikte interferonlarla MHC1 sınıfı antijenlerin yapımını uyarır (30).

### **2.2.2. Tümör Nekrozis Faktör (TNF- $\alpha$ )**

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) esas olarak T lenfositler ve makrofajlar tarafından sentezlenen ve sekretuar formu 17 KD, membran formu ise 26 KD olan bir sitokindir (31,32). TNF- $\alpha$ , immünoinflamatuvar reaksiyonlarda düşük konsantrasyonlarda ( $10^{-9}$  M) lokal etki gösteren güçlü parakrin ve otokrin düzenleyicidir. Aynı zamanda birçok hücre tipinde büyüme ve farklılaşmayı düzenler. Özellikle interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ile kombinasyonu sitotoksiktir. İn vivo olarak mürin sarkomlarının nekrozunda rol alır. Çalışmalar, TNF- $\alpha$ 'nın akut inflamasyonda ve antitümöral immünitede en önemli sitokin olduğunu göstermektedir. Nötrofil ve endotel hücrelerini uyararak adezyon ve kemotaksisi yönetir. TNF- $\alpha$ , aktive monositler, makrofajlar ve daha az çoğunlukta aktive T hücreler, B hücreler, mast hücreler, fibroblast, keratinosit, Kupffer hücreleri, düz kas, sinovial örtü hücreleri ve bazofil gibi birçok hücre tipinden salgılanmaktadır. Fibroblastların ve endotel hücrelerinin TNF- $\alpha$  aracılıklı proliferasyonu yara iyileşmesinde önemlidir. Ayrıca TNF- $\alpha$ , endotelial vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM)'nün sentezinde önemli bir uyarandır. TNF- $\alpha$  üretimi, IL-10, TGF- $\beta$ , PGE, siklosporin A, deksametazon, ibuprofen, metilprednizolon ve pentoksifilin tarafından inhibe edilir (13-19).

### **2.3. Lipopolisakkarid**

Gram-negatif bakteriler Gram boyama prosedürü sırasında kristal viyole boyasını tutmayan bakterilerdir. Gram-negatif bakterilerin pek çoğu patojendir. Yani, insanlarda hastalık yapma yetisine sahiplerdir. Bu hastalık yapma yetisi başlıca Gram-negatif hücre duvarının lipopolisakkarid (LPS) içeriğinden kaynaklanmaktadır. Canlı bir ortamda, gram negatif bir bakteri, dışarıdan eklenen LPS veya başka endotoksinler, bir dizi bağışıklık sistem tepkisi oluşturur. Üzerinde en çok araştırma yapılan toksin, gram negatif bakterideki LPS'dir. LPS yapısındaki Lipid A komponenti, toksisiteden sorumludur (3). Bu antijenik yapı ve toksinler dolaşımdaki mononükleer fagositik hücreleri CD 14 reseptörüne bağlanarak uyarırlar. Monositlerden tümör nekrozis faktör (TNF- $\alpha$ ), interlökin ve trombositleri aktive eden faktör ( PAF ) salınır (3).

## 2.4. Metformin

Metformin ( $C(=NH)NHC(=NH)N(CH_3)_2 HCl$ ) molekül ağırlığı 165,62 olan biguanid türevi oral antidiyabetiktir. Metformin, oral yolla alındıktan sonra gastrointestinal kanaldan yavaş absorbe edilir. Başlıca ince barsaktan emilir. Gıdalar metforminin emilimini azaltır, emilim süresini uzatır. İlacın mutlak biyoyararlanımı yaklaşık %50 - 60'dır. Oral yolla verilmesini takiben metformin plazma doruk konsantrasyonuna 1 - 3 saatte ulaşır. Plazma proteinlerine bağlanma oranı ihmal edilebilir seviyelerdedir. Zamana bağlı olarak eritrositler içine de girer. Kararlı plazma konsantrasyonlarına 24 - 48 saat içinde ulaşır. Metformin karaciğerde metabolizasyona uğramaz. Emilen ilacın %90'ı ilk 24 saat içinde başlıca tübüler salgılama ve idrar yolu ile atılır. Yarılanma ömrü yaklaşık 1,5 - 6 saattir. Klinik kullanım dozlarında, böbrek fonksiyonları normal olan diyabetik ve diyabetik olmayanlarda metformin farmakokinetikleri değişmez. Böbrek fonksiyon bozukluğu olanlarda ise metforminin plazma ve kan yarılanma ömrü uzar.

Karaciğerde glukoz yapımını azaltır, glukozun barsaklardan emilimini azaltır ve insülin duyarlılığını artırır (periferik glukoz alımını ve kullanımını artırır) (33). Metformin tedavisi ile açlık insülin seviyeleri ve gün boyu plazma insülin yanıtı artarken, insülin sekresyonu uyarılmaz. Etki mekanizması diğer oral antidiyabetik ajanlardan farklıdır. Metformin, insülin salınımını uyarmadığı için, sülfonilürelerden farklı olarak, ne tip 2 diyabetli hastalarda ne de normal kişilerde hipoglisemi oluşturmaz ve hiperinsülinemiye sebep olmaz. Metformin tedavisi sırasında, açlık insülin seviyeleri ve gün boyu süren plazma insülin cevabı artarken, insülin sekresyonu değişmez (34). Tip II diyabetik hastaların çoğunda normal olmayan serum lipid seviyeleri üzerine metforminin olumlu etkileri vardır. Tek başına metformin veya sülfonilüre ile kombinasyonu, diğer lipid seviyelerinde advers etki oluşturmaksızın, ortalama açlık serum trigliserid, total kolesterol ve LDL kolesterol seviyelerini düşürmektedir (35).

## 2.5. Metformin ve İnflamasyon

Yapılan son çalışmalar metforminin serum glukoz düzeyini düşürmesinin yanı sıra antiinflamatuvar etkilerinde olabileceğini de göstermiştir. Metforminin, sıçanlarda cerrahi sonrası (kısmı hepatektomi) LPS ile oluşturulan sepsis modelinde, hem proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu hem de hemostatik değişiklikleri azalttığı gösterilmiştir (3). Metformin LPS ile indüklenmiş proinflamatuvar sitokinleri azaltırken,

karaciğerde sentezlenen antiinflamatuvar sitokinlerin miktarını değiştirmemiştir (3). Metforminin, LPS veya oxLDL ile uyarılmış izole insan monositlerinde TNF- $\alpha$  yapımını ve doku faktörünün (TF) ekspresyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı bulunmuştur. İlave olarak hem TNF- $\alpha$  hem de TF mRNA düzeylerini azaltmıştır (4). Metformin aynı zamanda RAW 267.4 hücrelerinde interferon gama ve IL-17 ile indüklenen iNOS ve COX-2 ekspresyonunu da azaltmıştır (36). Tüm bu bulgular metforminin antiinflamatuvar etkisinin varlığını destekler ve inflamatuvar hastalıklarda tedavi edici rolü olabileceğini düşündürür.

## BÖLÜM III

### GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Malzemeler

Phosphate buffer saline (PBS) (200 ml/tb), RPMI 1640 media (100 ml/şişe), Ficoll histopaque 1083, E. Coli 0111:B4 lipopolisakkarid (endotoksin) Sigma'dan (Aldrich, Almanya) alındı. Metformin HCL (50 g), Bilim İlaç firmasından temin edildi. Rat TNF  $\alpha$  ve IL-6 ELISA kitleri (RayBio) Seha medikalden alındı. Heparin 25000 Ü flakon (Mustafa Nevzat İlaç Firması, Nevparin), penisilin G 1000000 Ü flakon (İ.E ULAGAY İlaç Firması, Penisilin-G), streptomisin 1 g flakon ( İ.E ULAGAY İlaç Firması, Streptomisin Sülfat), 15 ml ve 50 ml lik santrifüj tüpleri, EDTA lı tüpler, pipet uçları, steril pipetler (10 ml), cam pastör pipetler, ependorf tüpleri (1,5 ml) Seha medikalden alındı.

#### 3.2. Deney Hayvanlarının Seçimi

Erkek 200–250 g arası, 8–12 haftalık sağlıklı sıçanlar, Cumhuriyet Üniversitesi hayvan laboratuvarından temin edildi. Sıçanlar 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık ortamda, normal su ve normal yem ile serbest beslenmeye bırakıldı. Proje Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 04.03.2010 tarihli B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/31 sayılı kararla onaylanmıştır.

#### 3.3. Deney Hayvanlarından Kan örneklerinin Alınması

Sıçanlar Cumhuriyet Üniversitesi hayvan laboratuvarında xylazin + ketamin (xylazin 3 mg/kg subkutan, ketamin 90 mg/kg subkutan) ile anestezi yapıldıktan sonra, kan örnekleri, kardiyak puncture yöntemiyle, 10 ml'lik EDTA'lı steril enjektör kullanılarak, tek seferde alındı ve steril EDTA' lı tüplere konuldu.



### **3.4. Mononükleer Hücrelerin Ayırıştırılması**

Sıçanlardan alınan kan örnekleri 15 ml lik steril tüplere konuldu ve 1:1 oranında PBS ile sulandırıldı. Başka bir 15 ml'lik tüpe 3 ml Ficoll histopaque eklendi. Phosphate buffer saline ve kan karışımı Ficoll histopaque üzerine karışmayacak şekilde yavaşça eklendi 20 dakika santrifüj edildi (400xg). Santrifüj sonunda belirgin bir halka şeklinde ayrıışan mononükleer hücreler pastör pipet yardımıyla 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne alındı ve 10 ml PBS eklendi. Hafif şiddette çalkalama işlemi yapılarak hücreler yıkandı. 10 dakika santrifüj edildi (100xg), süpernatant atıldı, 10ml PBS eklenerek yıkama işlemi tekrar edildi. İkinci yıkamadan sonra dipte kalan hücreler, daha önce hazırlanan ml'sinde 2,5 Ü heparin, 100 Ü penisilinG, 100 µg streptomisin eklenmiş olan RPMI 1640 media ile (10 ml) sulandırıldı.

### **3.5. Hücrelerin Sayılması ve Morfolojik Yapılarının İncelenmesi**

Hücre stokundan alınan 1 ml'lik örnek, Thoma lamına yayılarak 10x büyütme altında sayımı yapıldı. Aynı şekilde alınan örnek morfolojik olarak incelendi ve mononükleer hücrelerin tanımı sağlandı. Hücrelerin morfolojik olarak tanımında, Giemsa ve Liscia - De Marchi boyama yöntemleri kullanıldı.

Giemsa yönteminde;

- a) 1 damla kan lam üzerine alındı
- b) Başka bir lam ile yayma preparat hazırlandı
- c) İyice kurutulduktan sonra, etil alkolde 7 dakika bekletilerek fiksasyon yapıldı.
- d) Daha sonra Giemsa boyası içerisinde 1 dk bekletildi ve bol distile su ile yıkandı.
- e) Kurutulduktan sonra başka lam ile entellan yardımıyla kapatılarak incelendi.

Liscia - De Marchi yönteminde;

- a) Yayma yapıldıktan sonra lam havada kurutuldu.
- b) 1-2 sn %0,9 luk serum fizyolojikle yıkandıktan sonra %96'lık etil alkolde birkaç kez çalkalama yapıldı.
- c) Solüsyon I içerisinde 3-4 dakika bekletildi ve %0,9 luk serum fizyolojikle yıkandı.
- d) Mavi su içerisinde 2 dk bekletildi ve fizyolojik su ile yıkandı.

- e) Solüsyon II içerisinde 1 dk, %96'lık etil alkolde ise 15 sn bekletildi. Daha sonra %100 alkolde 15 sn bekletildi.
- f) Ksilende şeffaflandırma yapılarak farklı lam ile entellan yardımıyla kapatıldıktan sonra mikroskopta incelenerek resimleri alındı ve hücrelerin tanımı yapıldı.

### **3.6. Hücrelerin Canlılıklarının Kontrolü**

Hücreler lam üzerine yayıldı ve lamelle kapatılarak, lam lamel arasındaki boşluktan 1µl Trypan Blue kullanılarak boyandı ve mikroskop altında canlılıklarına bakıldı. Hücre zarı yapısı bozulan hücreler mavi renk ile görüldü.

### **3.7. Lipopolisakkarid ve Metforminin Hazırlanması**

Lipopolisakkarid (LPS) 100 ng/ml ve 1 µg/ml olarak % 0,9 serum fizyolojik içerisinde hazırlandı. Metformin 2,5 µM, 25 µM, 250 µM olarak % 0,9 serum fizyolojik içerisinde hazırlandı. Hazırlanan solüsyonlar 2 mikron çapındaki enjektör filtreleriyle steril edildi.

### **3.8. Hücrelerin LPS ve Metforminle İnkübasyonu**

Hücreler 10 adet ependorf tüpüne alındı ( 20 - 40x10<sup>4</sup> hücre / ml) ve tüpler aşağıda belirtilen miktarlarda LPS ve/veya Metformin ile etüvde inkübasyona bırakıldı. (37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>) (Nuair, NU 5500E, A.B.D).

1. tüpe sadece taşıyıcı ( 20 µl steril % 0,9 serum fizyolojik )
2. tüpe taşıyıcı ve 100 ng LPS ( 1 ml)
3. tüpe taşıyıcı ve 1 µg LPS (1ml)
4. tüpe 100ng LPS ve 2,5 µM Metformin,
5. tüpe 100 ng LPS ve 25 µM Metformin
6. tüpe 100ng LPS ve 250 µM Metformin
7. tüpe 1 µg LPS ve 2,5 µM Metformin
8. tüpe 1µg LPS ve 25 µM Metformin
9. tüpe 1 µg LPS ve 250 µM Metformin
10. tüpe taşıyıcı ve 250 µM Metformin konuldu.

Bu protokole uygun olarak hücreler önce metformin ile 2,5 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda LPS eklenerek 5 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüm Ependorf tüpleri mikro santrifüj cihazında ( Sigma, 6-16K, Almanya ) 20 dakika santrifüj edildi (400xg), süpernatantlar alındı ve –80 °C de ELISA yapılana kadar saklandı.

### **3.9. Sitokinlerin ( TNF- $\alpha$ ve IL – 6 ) Ölçümü**

Ölçümler, kit içerisindeki prosedürlere göre ELİSA yöntemiyle yapılmıştır.

#### **3.9.1. TNF- $\alpha$ Ölçümü**

TNF- $\alpha$  düzeyleri ELISA kiti (RayBiotech Inc. A.B.D) kullanılarak ölçüldü. Ölçümde mikro plate reader (450nm dalga boyu seçilerek) kullanıldı.

- a) Kitte bulunan solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi.
- b) Solüsyonlarda gerekli seyreltme işlemleri yapıldı.
- c) Kitte bulunan 96 kuyucuklu tabağa, her kuyucuğa 100  $\mu$ l olacak şekilde standart ve örnekler eklendi. 2,5 saat oda ısısında, çalkalama cihazına konularak düşük hızda inkübe edildi.
- d) Tabağın içeriği tek hareketle döküldü ve kalınlaştırılmış kâğıt havlunun üzerine kapatılarak yavaşça üzerine vurularak, içeriğin tamamen dökülmesi sağlandı. Daha önceden seyreltilerek hazırlanan yıkama solüsyonu ile her kuyucuğa çoklu pipet ile 300  $\mu$ l yıkama solüsyonu eklendi ve tek hareketle döküldü. Bu yıkama işlemi 4 kez yapıldı.
- e) Daha önceden hazırlanmış Biotinlenmiş antikor solüsyonu 100  $\mu$ l olarak her kuyucuğua çoklu pipet yardımıyla eklendi ve 1 saat çalkalama cihazında düşük hızda ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
- f) Yıkama işlemi (d) aşamasındaki şekilde tekrarlandı.
- g) Streptavidin solüsyonu, (100  $\mu$ l) her kuyucuğa eklendi ve çalkalama cihazında düşük hızda ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
- h) Yıkama işlemi (d) aşamasındaki şekilde tekrarlandı.
- i) Substrat reaktifi, (100  $\mu$ l) her kuyucuğa eklendi ve alüminyum folyo ile ışık almayacak şekilde kapatıldıktan sonra, çalkalama cihazında düşük hızda 30 dakika inkübe edildi.

- j) Yıkama işlemi (d) aşamasındaki şekilde tekrarlandı.
- k) Her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve ELIZA plate reader ile 450 nm de absorbans değerleri kayıt edildi.

### 3.9.2. IL-6 Ölçümü

IL-6 düzeyleri ELISA kiti (RayBiotech Inc. A.B.D) kullanılarak ölçüldü. Ölçümde mikro plate reader (450nm dalga boyu seçilerek) kullanıldı.

TNF- $\alpha$  düzeyleri ELISA kiti (RayBiotech Inc. A.B.D) kullanılarak ölçüldü. Ölçümde mikro plate reader (450nm dalga boyu seçilerek) kullanıldı.

- a) Kitte bulunan solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi.
- b) Solüsyonlarda gerekli seyreltme işlemleri yapıldı.
- c) Kitte bulunan 96 kuyucuklu tabağa, her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde standart ve örnekler eklendi. 2,5 saat oda ısısında, çalkalama cihazına konularak düşük hızda inkübe edildi.
- d) Tabağın içeriği tek hareketle döküldü ve kalınlaştırılmış kâğıt havlunun üzerine kapatılarak yavaşça üzerine vurularak, içeriğin tamamen dökülmesi sağlandı. Daha önceden seyreltilerek hazırlanan yıkama solüsyonu ile her kuyucuğa çoklu pipet ile 300 µl yıkama solüsyonu eklendi ve tek hareketle döküldü. Bu yıkama işlemi 4 kez yapıldı.
- e) Daha önceden hazırlanmış Biotinlenmiş antikor solüsyonu 100 µl olarak her kuyucuğua çoklu pipet yardımıyla eklendi ve 1 saat çalkalama cihazında düşük hızda ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
- f) Yıkama işlemi (d) aşamasındaki şekilde tekrarlandı.
- g) Streptavidin solüsyonu, (100 µl) her kuyucuğa eklendi ve çalkalama cihazında düşük hızda ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
- h) Yıkama işlemi (d) aşamasındaki şekilde tekrarlandı.
- i) Substrat reaktifi, (100 µl) her kuyucuğa eklendi ve alimünyum folyo ile ışık almayacak şekilde kapatıldıktan sonra, çalkalama cihazında düşük hızda 30 dakika inkübe edildi.
- j) Yıkama işlemi (d) aşamasındaki şekilde tekrarlandı.
- k) Her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve ELIZA plate reader ile 450 nm de absorbans değerleri kayıt edildi.

### **3.10. İstatistik**

Sonuçlar Student-t (paired) testi kullanılarak değerlendirilmiştir.  $P<0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BÖLÜM IV

### BULGULAR

#### 4.1. Pilot Çalışmalar

Çalışma süresinde toplam 20 adet sıçan kullanıldı. Bunlardan 9 tanesi pilot çalışmada kullanıldı. Pilot çalışmalarda mononükleer hücrelerin ayrıştırılması, sayılması ve canlılık oranlarının kontrolü yapıldı. Geri kalan 11 sıçan ile deneyler yapıldı. 6 (altı) sıçan ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar, deney protokolü değiştirildiği ve/veya sonuçlar değerlendirilemediği için hesaplamalarda kullanılmadı. Geri kalan 5 sıçandan elde edilen sonuçlar değerlendirildi.

#### 4.2. Hücrelerin Canlılıklarının Kontrolü

Hücreler lam üzerine yayıldı ve lamelle kapatılarak, lam lamel arasındaki boşluktan 1 µl Trypan Blue kullanılarak boyandı ve mikroskop altında canlılıklarına bakıldı. Hücre zarı yapısı bozulan hücreler mavi renk ile görüldü. Canlılık oranları >%98 olarak bulundu.

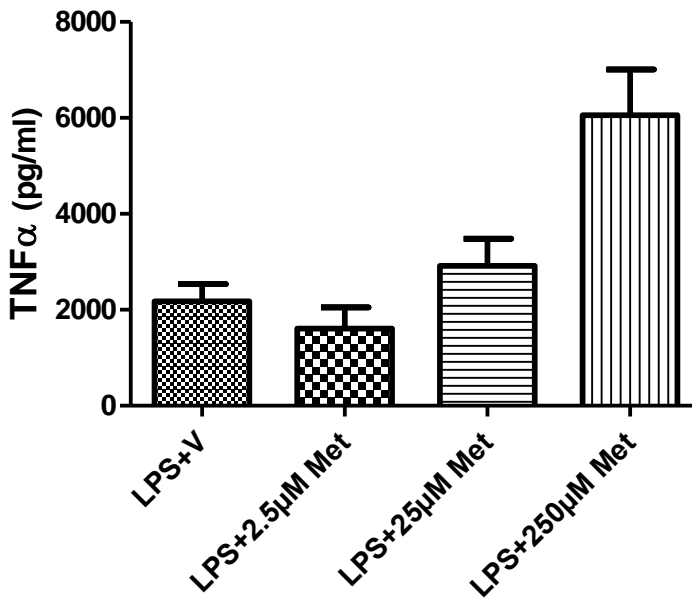
#### 4.3. TNF- $\alpha$ Miktarları

LPS 100ng/ml ile, LPS + metformin (2,5µM, 25µM, 250µM) karşılaştırıldığında (2179±359 ve 1613±437, 2915±57, 6059±948 pg/ml), aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05) (Çizelge.4.1, Şekil.4.2). Metformin tek başına verildiğinde TNF- $\alpha$  miktarları üzerinde bir etki oluşturmadı.

**Çizelge.4.1.** Mononükleer hücrelerden LPS (100ng/ml) ve LPS + Metformin (2.5, 25, 250µM) etkisi ile salıverilen TNF-α (pg/ml) miktarları (ort.± standart hata, p değerleri LPS 100ng/ml ile karşılaştırıldığında).

LPS (100ng/ml) (n=5)	LPS+Met (2.5µM) (n=5)	LPS+Met (25µM) (n=5)	LPS+Met(250µM) (n=3)
TNF-α (pg/ml) 2179±359	TNF-α (pg/ml) 1613±437	TNF-α (pg/ml) 2915±572	TNF-α (pg/ml) 6059±948
p değeri	0.197	0.304	0.123

Met: Metformin, LPS: Lipopolisakkarid, V: Taşıyıcı



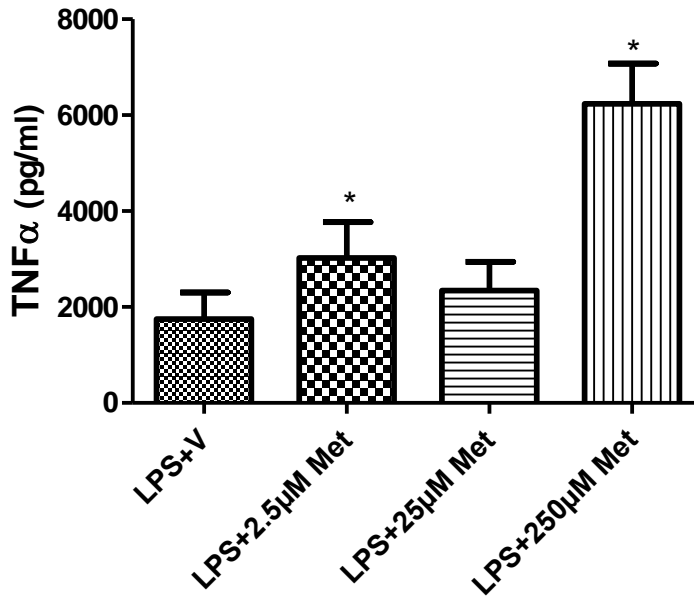
**Şekil.4.2.** LPS (100ng/ml) ile indüklenmiş mononükleer hücrelerden LPS ve LPS + Metformin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α miktarları (pg/ml, ort.±standart hata). Met: Metformin, LPS: Lipopolisakkarid, V:Taşıyıcı

LPS 1µgr/ml ile, LPS + metformin (2,5µM, 25µM, 250µM) karşılaştırıldığında (1752±553 ve 3023±745, 2344±598, 6238±841 pg/ml), 2,5µM ( $p<0,05$ ) ve 250µM ( $p<0,05$ ) metformin TNF-α değerlerini anlamlı şekilde artırırken, 25µM metformin anlamlı bir fark oluşturmadı ( $p>0,05$ )(Çizelge.4.2, Şekil.4.3).

**Çizelge.4.2.** Mononükleer hücrelerden LPS (1µg/ml) ve LPS + Metforminin (2.5, 25, 250µM) etkisi ile salıverilen TNF-α (pg/ml) miktarları (ort.± standart hata, p değerleri LPS 100ng/ml ile karşılaştırıldığında, \*p<0.05).

LPS (1µgr/ml) (n=5)	LPS+Met (2.5µM) (n=5)	LPS+Met (25µM) (n=5)	LPS+Met(250µM) (n=3)
TNF-α (pg/ml) 1752±553	TNF-α (pg/ml) 3023±745*	TNF-α (pg/ml) 2344±598	TNF-α (pg/ml) 6238±841*
p değeri	0.044*	0.108	0.021*

Met: Metformin, LPS: Lipopolisakkarid, V: Taşıyıcı.



**Şekil.4.3.** LPS (1µg/ml) ile indüklenmiş mononükleer hücrelerden, LPS ve LPS + Metformin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α miktarları (pg/ml, ort.±standart hata, \*p<0.05). Met: Metformin, LPS: Lipopolisakkarid, V: Taşıyıcı

#### 4.4. TNF-α Miktarlarının LPS'nin Yüzdesi Olarak Değerlendirilmesi

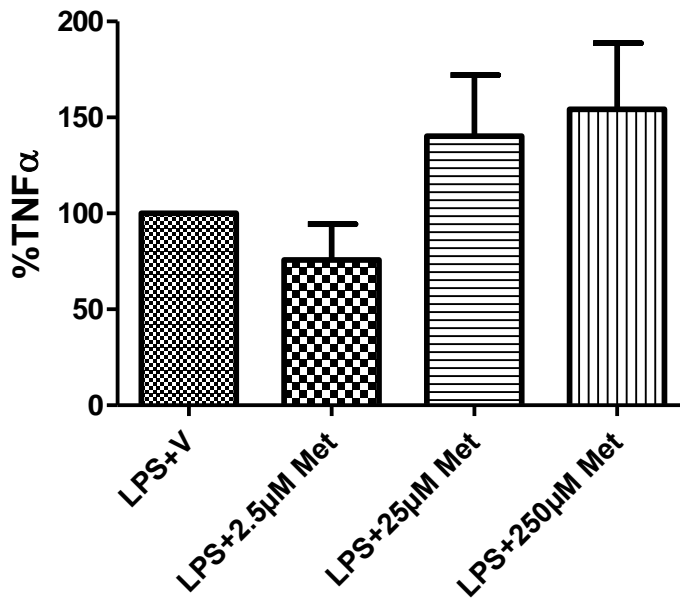
TNF-α miktarları, LPS 100ng/ml+metformin taşıyıcı ile elde edilen değerler 100 kabul edilerek, bu değer yüzdesi olarak hesaplandığında, LPS 100ng/ml ile LPS + metformin (2,5 µM, 25 µM, 250 µM) arasındaki (100±0.0 ve 75±18, 140±31, 154±34), farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05)(Çizelge.4.3, Şekil.4.4).



**Çizelge.4.3.** Mononükleer hücrelerden LPS(100ng/ml+V) ve LPS+Metformin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α miktarlarının, LPS 100ng/ml'nin yüzdesi olarak ifadesi (ort.±standart hata, p değerleri LPS 100ng/ml ile karşılaştırıldığında).

LPS (100ng/ml) (n=5)	LPS+Met (2.5µM) (n=5)	LPS+Met (25µM) (n=5)	LPS+Met (250µM) (n=3)
100±0	75,7±18,7	140,2±31,8	154,3±34,4
p değeri	0,264	0,276	0,255

Met: Metformin, LPS: Lipopolisakkarid, V: Metformin taşıyıcı.



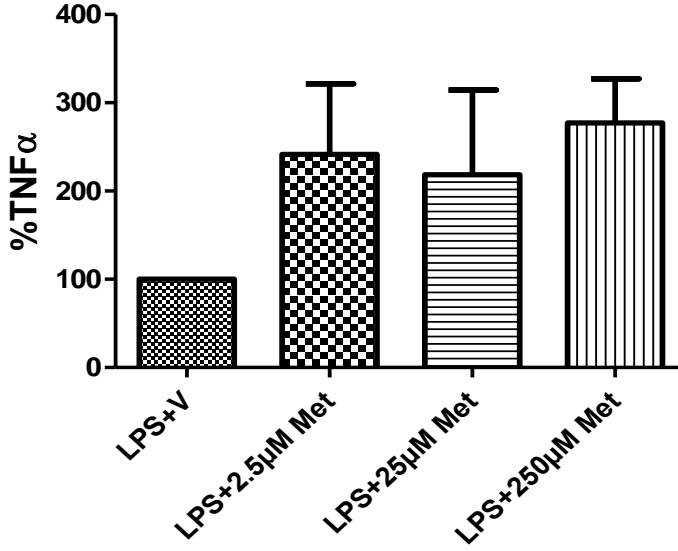
**Şekil.4.4.** Mononükleer hücrelerden LPS(100ng+V) ve LPS + Metformin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α miktarlarının, LPS 100ng/ml'nin yüzdesi olarak ifadesi (ort.±standart hata). Met: Metformin, LPS: Lipopolisakkarid, V:Metformin taşıyıcı

TNF-α miktarları, LPS 1µg/ml+metformin taşıyıcı ile elde edilen değerler 100 kabul edilerek bu değer yüzdesi olarak hesaplandığında, LPS 1µg/ml ile LPS+metformin (2,5 µM, 25 µM, 250 µM) arasındaki (100±0.0 ve 241±80, 218±95, 277±50), farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05)(Çizelge.4.4, Şekil.4.5).

**Çizelge.4.4.** Mononükleer hücrelerden LPS(1µg/ml+V) ve LPS+Metforminin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α miktarlarının, LPS 1µg/ml'nin yüzdesi olarak ifadesi (ort.±standart hata, p değerleri LPS 1µg/ml ile karşılaştırıldığında).

LPS (1µgr/ml) (n=5)	LPS+Met (2.5µM) (n=5)	LPS+Met (25µM) (n=5)	LPS+Met (250µM) (n=5)
100±0	241±79,9	218,6±95,8	277±50,1
P>0.05	0,151	0,284	0,072

Met: Metformin, LPS: Lipopolisakkarid, V: Metformin taşıyıcı.



**Şekil.4.5.** LPS (1µgr/ml) ile indüklenmiş mononükleer hücrelerden, LPS ve LPS+ Metforminin (2.5, 25, 250µM) aracılığı ile salınan TNF-α değerlerinin, LPS 1µgr/ml'nin yüzdesi olarak ifadesi (ort.±standart hata, p değerleri LPS 1µg/ml ile karşılaştırıldığında). Met: Metformin, LPS: Lipopolisakkarid, V: Metformin taşıyıcı.

#### 4.5. IL-6 Ölçüm Değerleri

Bütün deneylerde IL-6 miktarları ölçülebilir düzeyde değildi.

## BÖLÜM V

### TARTIŞMA

Metformin, hem tek başına, hem de diğer oral antidiyabetiklerle birlikte diyabet tedavisinde en sık kullanılan ilaçtır (37,38). Yağdan zengin diyetle beslenen sıçanlarda, metformin, karaciğer ağırlığında değişim yapmamakla beraber, karaciğerin trigliserid içeriğinde anlamlı azalma yapmıştır. İlave olarak hepatik proteinlerde nitrozilasyonu ve iNOS indüklenmesini güçlü bir şekilde inhibe etmiştir. Bu antiinflamatuvar etkisi, karaciğer dokusunda TNF- $\alpha$  miktarının ve MMPs aktivitesinin azaltılması ile teyit edilmiştir (5).

Metformin, kısmi hepatektomi yapılmış deney hayvanlarında LPS ile oluşturulan karaciğer fonksiyon bozukluklarını, karaciğerde nötrofil birikimini ve karaciğerde IL-6 ve interferon- $\gamma$  artışını engellemiştir (3). Benzer şekilde, hayvan deneylerinde oluşturulan non-alkolik steatohepatit modellerindeki hepatik inflamasyon ve insandaki benzer klinik tablo metformin tarafından azaltılmıştır (39,40). İn-vitro olarak, sitokinlere maruz bırakılan insan umbilikal ven endotel hücrelerinin oluşturduğu inflamatuvar yanıtta metformin tarafında azaltılmıştır (41). İntratrakeal LPS injeksiyonu ile oluşturulan akut akciğer hasarı modellerinde, farelerde, metformin, antiinflamatuvar etki göstermiş olup, bu etkisi kan şekerini düşürücü etkisinden bağımsızdır (42). Zira bu hayvanlarda kan şekeri yüksek bulunmuştur. Metformin, akut akciğer hasarı gibi akut inflamatuvar durumları önlemek için faydalı olabilir. Jaroslaw W. vd (2008) farelerden elde edilen nötrofilleri, metformin (0-250 $\mu$ M, 2.5 saat) ve/veya LPS (100ng/ml, 5 saat) ile inkübe etmişlerdir (önce metformin sonra LPS eklenmiş) (42). Metformin, LPS ile indüklenen hücrelerden salınan TNF- $\alpha$  miktarını anlamlı bir şekilde azaltmıştır (yaklaşık olarak %50 ).

Jaroslaw W. vd'nin (2008) uyguladığına benzer bir deney protokolü bu çalışmada kullanılmıştır (42). Bu çalışmada, üç farklı konsantrasyonda uygulanan metformin (2,5, 25, 250 $\mu$ M), LPS (100ng/ml) ile indüklenmiş TNF- $\alpha$  sentez ve salınımına karşı anlamlı bir azaltıcı etki göstermedi. Sadece 2,5 $\mu$ M metformin ile olan grupta TNF- $\alpha$  değerleri %37 civarında düşmesine rağmen istatistiksel anlamlı farka ulaşamadı. Diğer iki konsantrasyonda uygulanan metformin, TNF- $\alpha$  değerlerini azaltmadığı gibi artırdı. Özellikle 250 $\mu$ M konsantrasyondaki metformin, LPS ile indüklenen TNF- $\alpha$  miktarını

yaklaşık %50 oranında arttırdı. Metformin insanda kullanıldığı dozlarda etkin kan konsantrasyonu yaklaşık olarak  $2\mu\text{M}$  civarındadır. Dolayısıyla,  $250\mu\text{M}$  etkin konsantrasyonun yaklaşık olarak 100 kat fazlasıdır. Bu nedenle, bu konsantrasyonda toksik etkilerin ortaya çıkması beklenebilir. Bu çalışmada, LPS  $1\mu\text{gr/ml}$  dozunda da kullanılmıştır. Metformin yine üç değişik konsantrasyonda bu doz LPS ile inkübe edilince, TNF- $\alpha$  miktarlarını azaltmadığı gibi yaklaşık olarak %100-150 oranında arttırmıştır. Bu artış 2,5 ve  $250\mu\text{M}$  konsantrasyonda uygulanan metformin ile istatistiksel anlama ulaştı. Bu da yine artmış LPS toksisitesinin, düşük doz metformin ile engellenemediği, yüksek dozlarda ise metforminin kendi toksisitesinde olaya karıştığı şekilde yorumlanabilir.

Bu çalışmadaki sonuçlar ile, Jaroslaw W. vd'nin(2008) bulguları arasındaki farklılık iki şekilde açıklanabilir (42). Bunlardan birincisi, çalışmalarda kullanılan türlerin farklı olmasıdır. Bu çalışmada sıçan kullanılırken, diğer çalışmada fare kullanılmıştır. İkincisi, bu çalışmada mononükleer hücreler kullanılmışken Jaroslaw W. vd. (2008) nötrofilleri kullanmıştır (42). TNF- $\alpha$  primer olarak makrofajlardan salgılandığı için, kullanılan hücre türünün farklı olması da sonuçların farklı olmasını açıklayabilir.

Metforminin glukoz metabolizması üzerindeki etkilerine ilave olarak, plazminojen aktivatör inhibitörünü (PAI)-1, von-Willebrand faktörünü ve düz kas hücre kontraktilesini azalttığı gösterilmiştir (43,44,45). İlaveten, metformin, bazı polikistik over sendromu vakalarında plazmada, soluble intrasellüler adezyon molekülü, vasküler hücre adezyon molekülü-1, makrofaj migrasyonu inhibitör faktör ve CRP gibi inflamasyon belirteçlerini de azalttığı gösterilmiştir (46,47,48). Bu çalışmalarda, metforminin inflamasyonun modülasyonunda rolü olduğunu düşüncesini destekleyen sonuçlar elde edilmiştir.

Kikuo Isoda vd.(2006) metforminin, IL-1 $\beta$  ile indüklenen insan düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve makrofajlardan IL-6 salınımını inhibe ettiğini bulmuştur (49). Bizim çalışmamızda ise LPS, IL-6 salınımı üzerinde bir etki göstermedi. Metforminin de hem tek başına hem de LPS ile indüklenen hücrelerden IL-6 üzerinde bir etkisi yoktu. Bu farklılık hücrelerin elde edildiği türlerin farklı olması ile açıklanabilir.

Klinik çalışmalar, metforminin, diyabetik hastalardaki kardiyovasküler olayları düzeltici etkisinin glukoz düzenleyici etkisinden bağımsız olduğu ve metforminin insan vasküler düz kas, endotel hücreleri ve makrofajlarda IL-6 ve IL-8 salınımını azalttığı

bulunmuştur (49). Bu antiinflamatuvar etkilerini insanda tedavide kullanılan kan konsantrasyonlarında göstermiştir.

AMP aracılı aktive olan protein kinaz (AMPK) aktivitesi, hücre içindeki AMP/ATP oranı aracılığıyla düzenlenir ve hücre içi enerji düzenlenmesi ve metabolik strese önemli rol oynar. Metforminin AMPK'yı aktive ettiği gösterilmiştir. Yoshiyuki Hattori ve arkadaşları metforminin, insan umbilikal ven endotel hücrelerinde, TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  ile indüklenen proinflamatuvar ajanlar ve adezyon moleküllerinin oluşumunu AMPK'yı aktive ederek azalttığı gösterilmiştir (41). Bu nedenle metforminin, diyabetik hastalarda antiaterojenik bir ilaç olarak etkili olabileceği yorumu yapılmıştır..

Obezlerde, plazmada proinflamatuvar bir durum olan, migrasyon inhibitör faktör (MIF) konsantrasyonunun ve mononükleer hücrelerde mRNA ekspresyonunun artmış olduğu bulunmuştur. Bu artış vücut kitle indeksi, serbest yağ asitleri ve CRP ile ilişkilidir. Metformin tedavisi obezlerde plazma MIF konsantrasyonunu azaltmıştır ve bu sonucun ilacın potansiyel antiinflamatuvar etkisine katkısı olduğunu düşündürmüştür. MIF proinflamatuvar bir sitokin olup, deney hayvanlarında endotoksin uygulanmasından sonra plazma konsantrasyonu artar (50,51,52). MIF salınımının artması için gerekli olan endotoksin miktarı TNF- $\alpha$  salınımını arttırmak için gerekli olan miktarın 10'da biridir (53). MIF makrofajlar ve adrenokortikotropik (ön hipofiz) hücrelerinden salıverilen ve sekretuar hücrelerde depo edilen tek sitokindir.

Yoğun bakım hastalarında hiperglisemi sık görülür ve tedavide insülin kullanılır. Ghazal ve arkadaşları, insülin tedavisine metformin eklenmesiyle bu hastalarda plazma TNF- $\alpha$ , IL-6 ve nitrik oksit miktarları anlamlı bir şekilde düşürdüğünü bulmuştur (54). İnsülin tek başına verildiğinde de bu inflamasyon parametrelerinde düşme olmuştur. Ancak bu düşüş metformin eklenmesiyle daha belirgin bir hale gelmiştir (54). Bu çalışmada kullandığımız sıçanlar sağlıklıydı (diyabetik, obez, yada herhangi bir inflamatuvar hastalık yoktu). Oysa literatürde kullanılan hücreler ve hayvan modellerinde, ya hastalar ya da obez örnekler kullanılmıştır. Bu çalışmada sağlıklı sıçanların kullanılmış olması, elde ettiğimiz sonuçların diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlardan farklı olmasını açıklayabilir. Hastalardan veya obez hayvanlardan alınan hücrelerin yanıtları farklılık gösterebilir. Ancak TNF- $\alpha$  değerleri üzerindeki etkisi açısından farklı çalışmalar vardır (55,56). Bazı çalışmalarda, obez olmayan deneklerde metformin TNF- $\alpha$  değerlerini ya artırmış yada bir etki göstermemiştir.

Bu çalışmada, metformin, 100ng/ml LPS ile indüklenen sıçan mononükleer hücrelerinden, TNF- $\alpha$  salınımını, düşük konsantrasyonda (2,5  $\mu$ M) azaltmaya, yüksek

konsantrasyonlarda (25  $\mu$ M ve 250  $\mu$ M) ise arttırmaya yönelik bir etki gösterdi. Ancak bu etkiler istatistiksel olarak anlamlı çıkmadı. Hücreler 1 $\mu$ g/ml LPS ile indüklendiğinde ise, metformin her 3 konsantrasyonda da TNF- $\alpha$  salınımını artırdı. Bu artış 2,5  $\mu$ M ve 250  $\mu$ M konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. IL-6 ise bu çalışmada ölçülebilir değerlere ulaşmadı. Sonuç olarak bulgularımız literatür bilgilerini dekteklememektedir. Farkın sebebi tür farklılıkları, deney koşulları farklılıkları ve kullanılan metformin konsantrasyonların farklı olması ile açıklanabilir.

## BÖLÜM VI

### KAYNAKLAR

- [1]Beutler BA.(2009) TLRs and innate immunity. *Blood*. 2009 Feb 12;113(7):1399-407. Epub 2008 Aug 29.
- [2]Medzhitov R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001 Nov;1(2):135-45.
- [3]Bergheim I, Luyendyk JP, Steele C, Russell GK, Guo L, Roth RA, Arteel GE.,(2006) Metformin prevents endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Mar;316(3):1053-61. Epub 2005 Dec 1.
- [4]Arai M, Uchiba M, Komura H, Mizuochi Y, Harada N, Okajima K.(2010) Metformin, an antidiabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Jul;334(1):206-13.
- [5]Raso GM, Esposito E, Iacono A, Pacilio M, Cuzzocrea S, Canani RB, Calignano A, Meli R., (2009) Comparative therapeutic effects of metformin and vitamin E in a model of non-alcoholic steatohepatitis in the young rat. *Eur J Pharmacol*. 2009 Feb 14;604(1-3):125-31. Epub 2008 Dec 14.
- [6]Derosa G, Maffioli P, Salvadeo SA, Ferrari I, Ragonesi PD, Querci F, Franzetti IG, Gadaleta G, Ciccarelli L, Piccinni MN, D'Angelo A, Cicero AF.(2010) Effects of sitagliptin or metformin added to pioglitazone monotherapy in poorly controlled type 2 diabetes mellitus patients. *Metabolism*. 2010 Jun;59(6):887-95. Epub 2009 Dec 16.
- [7]Çevikbaş U. (1995) *Temel Patoloji*. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul;1995:25-60
- [8]Mullington JM, Hinze-Selch D, Pollmächer T. (2001) Mediators of inflammation and their interaction with sleep: relevance for chronic fatigue syndrome and related conditions. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Mar;933:201-10.
- [9]Aghabeigi B.(1992) The pathophysiology of pain. *Br Dent J*. 1992 Aug 8-22;173(3):91-7.
- [10]Sessle BJ.(2001) New insights into peripheral chemical mediators of pain and inflammation. *J Orofac Pain* 2001;15:1-5.
- [11]Sies H.(1992)Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochemistry*1993;215:213-9.
- [12]Filiz Kuralay, Zahide Çavdar (2006) *Genel Tıp Derg* 2006;16(3):143-152
- [13]Bienvenu J.(1995) Exploration of cytokines in biological fluids. *CR Seances Soc Biol Fil* 1995;189:545-55.
- [14]Takabayashi T, Vannier E, Clark BD, Margolis NH, Dinarello CA, Burke JF, Gelfand JA. (1996) A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis. *J Immunol*. 1996 May 1;156(9):3455-60.
- [15]Cheeseman KH, Slater TF.(1993) An introduction to free radical biochemistry. *British Med Bulletin* 1993;49:481-93.
- [16]Haeggstrom JZ, Kull F, Rudberg PC, Tholander F, Thunnissen MM.(2002) Leukotriene A4 hydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68:495-510.
- [17]Park EJ, Barbul A.(2004) Understanding the role of immune regulation in wound ealing. *American J Surgery* 2004;187:11S-6S.

- [18] Drenth JP, Van Uum SH, Van Deuren M. (1995) Endurance run increased circulating IL-6 and IL-1 $\alpha$  but down-regulates ex-vivo TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production. *J Appl Physiol* 1995;79:1497-503.
- [19] Armstrong L, Jordan N, Millar A. (1996) Interleukin 10 regulation of TNF- $\alpha$  from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax* 1996;51:143-9.
- [20] Durum SK, Openheim JJ. (1993) Proinflammatory cytokines and immunity. In: Paul WE. *Fundamental Immunology*. 3<sup>rd</sup> ed. New York Raven Press Ltd 1993; 801-835.
- [21] Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. (1991) Cytokines. In Sites DP, Terr AT. *Basic and Clinical Immunology*. 7<sup>th</sup> ed. California: Appleton and Lange 1991; 78-101.
- [22] Kishimoto T. (1989) The biology of IL-6. *Blood* 1989; 74: 1-10.
- [23] Dinarello CA. (1993) IL-1 and TNF. In: Lachman PJ, Peters DK, Rosen FS, Walport MJ. *Clinical Aspects of Immunology*. 5<sup>th</sup> ed. Boston: Blackwell Scientific Publication 1993; 1: 267-313.
- [24] Lau AS. (1994) Cytokines in the pathogenesis and treatment of infectious diseases. In: Aranoff SC, Hughes WT, Kohl S, Speck WT, Wald ER. *Advances in Pediatric Infectious Diseases*. Chicago: Mosby Year Book 1994; 211-231.
- [25] Girardin EP, Berner ME, Grau GE, Suter S, Lacourt G, Paunier L. (1990) Serum tumour necrosis factor in newborns at risk for infections. *Eur J Pediatr*. 1990 Jun;149(9):645-7.
- [26] Groll AH, Meiser A, Weise M, Rettwitz-Volk W, von Loewenich V, Gussetis ES, Kornhuber B. (1992) Interleukin 6 as early mediator in neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 1992 Jun;11(6):496-8.
- [27] Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA. (1989) Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*. 1989 Oct;74(5):1704-10.
- [28] Rusconi F, Parizzi F, Garlaschi L, Assael BM, Sironi M, Ghezzi P, Mantovani A. (1991) Interleukin 6 activity in infants and children with bacterial meningitis. The Collaborative Study on Meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 1991 Feb;10(2):117-21.
- [29] Sullivan JS, Kilpatrick L, Castarino AT Jr, Lee SC, Harris MC. (1992) Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis. *J Pediatr* 1992; 120: 510-515.
- [30] Alam R. (2003) Chemokines in cell movement and inflammation. Rosenwasser LJ, Borish L. Cytokines in allergic inflammation. Church MK, Shute JK, Sampson AP. Mast cell-derived mediators. Hirota K, Adolphson CR, Gleich GC. Biology of eosinophils. In: Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, Bachner BS, Holgate ST, Simons FER. *Middleton's Allergy*. 6<sup>th</sup> ed. USA: Mosby 2003; 164-165, 138-139, 205, 314.
- [31] Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1988 Apr 8;53(1):45-53.
- [32] Tang P, Hung M-C, Klostergaard J (1996). "Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer". *Biochemistry* 35 (25):8216-25. doi:10.1021/bi952182t. PMID 8679576



- [33] Adler, A. I., Shaw, E. J., Stokes, T. and Ruiz, F. (2009) Newer agents for blood glucose control in type 2 diabetes: summary of NICE guidance. *BMJ* 338, b1668
- [34] Nathan, D. M., Buse, J. B., Davidson, M. B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Sherwin, R. And Zinman, B. (2009) Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 32, 193–203
- [35] Selvin, E., Bolen, S., Yeh, H. C., Wiley, C., Wilson, L. M., Marinopoulos, S. S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, R., Bass, E. B. and Brancati, F. L. (2008) Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review. *Arch. Intern. Med.* 168, 2070–2080
- [36] Nath N, Khan M, Paintlia MK, Singh I, Hoda MN, Giri S. (2009) Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009 Jun 15;182(12):8005-14
- [37] Setter SM, Iltz JL, Thams J, Campbell RK.(2003) Metformin hydrochloride in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a clinical review with a focus on dual therapy. *Clin Ther* 2003;25:2991-3026.
- [38] Deeks ED, Scott LJ.(2006) Pioglitazone/metformin. *Drugs* 2006;66:1863-77.
- [39] Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM.(2000) Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med.* 2000 Sep;6(9):998-1003.
- [40] Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N.(2001) Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet.* 2001 Sep 15;358(9285):893-4.
- [41] Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K.(2006) Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* 2006;47: 1183–1188.
- [42] Jaroslaw W, Zmijewski1,2, Emmanuel Lorne1,3\*, Xia Zhao1\*, Yuko Tsuruta1, Yonggang Sha1, Gang Liu1, Gene P. Siegal4, and Edward Abraham.(2008) Mitochondrial Respiratory Complex I Regulates Neutrophil Activation and Severity of Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 178. pp 168–179, 2008.
- [43] Nagi DK, Yudkin JS.(1993) Effects of metformin on insulin resistance, risk factors for cardiovascular disease, and plasminogen activator inhibitor in NIDDM subjects. A study of two ethnic groups. *Diabetes Care.* 1993;16:621– 629.
- [44] Dominguez LJ, Davidoff AJ, Srinivas PR, Standley PR, Walsh MF, Sowers JR.(1996) Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *Endocrinology.*1996;137:113–121.
- [45] Bhalla RC, Toth KF, Tan E, Bhatti RA, Mathias E, Sharma RV.(1996) Vascular effects of metformin. Possible mechanisms for its antihypertensive action in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.* 1996;9:570 –576.
- [46] Caballero AE, Delgado A, Aguilar-Salinas CA, Herrera AN, Castillo JL, Cabrera T, Gomez-Perez FJ, Rull JA.(2004) The differential effects of Metformin on markers of endothelial activation and inflammation in subjects with impaired glucose tolerance: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3943–3948.

- [47] Morin-Papunen L, Rautio K, Ruokonen A, Hedberg P, Puukka M, Tapanainen JS.(2003) Metformin reduces serum C-reactive protein levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:4649–4654.
- [48] Dandona P, Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Tripathy C, Hofmeyer D, Chaudhuri A. (2004) Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5043–5047.
- [49] Kikuo Isoda, James L. Young, Andreas Zirlik, Lindsey A. MacFarlane, Naotake Tsuboi, Norbert Gerdes, Uwe Schoenbeck, Peter Libby.(2006) Metformin Inhibits Proinflammatory Responses and Nuclear Factor- $\kappa$ B in Human Vascular Wall Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:611-617
- [50] Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:345–350
- [51] Roger T, Glauser MP, Calandra T (2001) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. *J Endotoxin Res* 7:456–460.
- [52] Froidevaux C, Roger T, Martin C, Glauser MP, Calandra T (2001) Macrophage migration inhibitory factor and innate immune responses to bacterial infections. *Crit Care Med* 29:S13–S15.
- [53] Baugh JA, Bucala R (2002) Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med* 30 (1 Suppl):S27–S35.
- [54] Ghazal Ansari, Mojtaba Mojtahedzadeh, Farshad Kajbaf.(2008) How Does Blood Glucose Control with Metformin Influence Intensive Insulin Protocols? Evidence for Involvement of Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines. *Adv Ther.* 2008;25(7):681–702.
- [55] Carlsen SM, Waage A, Grill V, Folling I.(1998) Metformin increases circulating tumor necrosis factor-alpha levels in non-obese non-diabetic patients with coronary heart disease. *Cytokine.* 1998;10:66–69.
- [56] Biarnes J, Fernandez-Real JM, Fernandez-Castaner M, del Mar Garcia M, Soler J, Ricart W.(2005) Differential regulation of insulin action and tumor necrosis factor alpha system activity by metformin. *Metabolism.* 2005;54:235–239.